

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05555

研究課題名（和文）空隙層に近赤外蛍光色素を内包するラトル型シリカナノ粒子の合成と細胞イメージング

研究課題名（英文）Synthesis of Rattle-Type Silica Nanoparticles Containing Near-Infrared Fluorescent Dyes in Their Void Layer and Fluorescent Cell Imaging

研究代表者

中原 佳夫（Nakahara, Yoshio）

和歌山大学・システム工学部・准教授

研究者番号：10432600

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：近赤外蛍光色素を物理吸着によって内包する蛍光性のナノ粒子が、シリカナノ粒子をシード粒子とするシード媒介成長法によって簡単に合成された。粒子表面をタンニン酸で被覆することで、生体適合性が付与されるとともに蛍光色素の光安定性が向上した。また、蛍光色素修飾シリカナノ粒子について、塩基や加熱によって部分的なシリカエッチングが行われ、ラトル型へと変換された。このエッチング操作によって励起光の透過性が向上し、結果として粒子からの蛍光強度が増加した。最終的に、タンニン酸被覆オキサジン725内包シリカナノ粒子はアフリカミドリザル腎臓由来細胞の蛍光イメージングのためのラベル化剤として用いることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに開発された近赤外蛍光性シリカナノ粒子のほとんどの場合で、蛍光色素は化学結合によってシリカナノ粒子に導入されていたが、本研究ではシード媒介成長法を用いることで、物理吸着によって簡単に蛍光色素をシリカナノ粒子に導入できた。これにより本合成法を適用すれば、他の種類の近赤外蛍光色素についてもシリカナノ粒子に簡単に導入できると期待される。また、蛍光色素修飾シリカナノ粒子を熱エッチングしてラトル型へと変換することで、結果として粒子からの蛍光強度が増加することを明らかにした。本手法は、今後の蛍光性シリカナノ粒子の化学修飾の指針になり得ると思われる。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent silica nanoparticles (SiNPs) containing near-infrared fluorescent dyes by physical adsorption were easily prepared by the seed-mediated growth method using SiNPs as seed particles. The surface of SiNPs was covered with tannic acid (TA), which resulted in the improvement of biocompatibility and photostability of fluorescent dyes. Also, the silica moiety of SiNPs modified with fluorescent dyes were partly etched by base and heat, and they were transformed into rattle-type SiNPs. This etching process improved the transparency of excitation light and as a result the fluorescence intensity originated from SiNPs increased. Finally, TA-coated SiNPs containing Oxazine725 were usable as a label agent for the fluorescent imaging of African green monkey kidney cells.

研究分野：分析化学

キーワード：シリカナノ粒子 近赤外蛍光色素 物理吸着 ラトル型 エッチング 蛍光細胞イメージング 水分散
タンニン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、より簡便なガン診断への期待から、蛍光を利用する細胞染色（イメージング）剤の開発要求が高まりつつある。細胞染色剤としては、紫外～可視光領域の光は生体中の水やヘモグロビンによってほとんど吸収されることから、インドシアニンググリーンに代表される近赤外蛍光色素が期待されている。しかし、これらの化合物は水溶性に乏しいことや水中で会合して濃度消光を起こしやすいことが実用化のための高い障壁となっている。そこで、近赤外蛍光色素を水中で有効に活用するために、ナノ粒子に固定化する試みが注目を集めている。

(2) 蛍光色素のナノ粒子への固定化は、通常、化学結合によって行われる。これにより、ナノ粒子からの蛍光色素の漏出が抑えられる。しかし、粒子への固定化によって蛍光色素の分子運動が制限されるために、蛍光特性が損なわれることが問題であった。また、近赤外蛍光色素は塩基性条件下で加熱によって分解しやすいことから、反応性官能基を用いて化学反応によって蛍光色素をナノ粒子に導入することが困難とされており、化学結合による固定化は汎用の一部の蛍光色素でのみ検討が行われてきた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、近赤外蛍光色素を溶液中と同程度の運動性を保ったままでナノ粒子内に固定化する新しい手法について検討する。即ち、ラトル型シリカナノ粒子をコアとし、その空隙層に近赤外蛍光色素を物理的に固定化し、最表面をタンニン酸（シェル）とするコアシェルナノ粒子の開発を行う。ラトル型ナノ粒子とは、ナノ粒子が空隙層を挟んでナノ粒子を内包する構造の粒子のことを言う。ラトル型ナノ粒子においては、ナノ粒子内の蛍光色素は溶液中の特性を維持したまま近赤外蛍光を発し、また近赤外光は生体透過性および生体適合性に優れるため、本研究で開発する近赤外蛍光性ナノ粒子は生体応用性の高い蛍光細胞染色剤となり得ると考えた。

(2) (1)で記したナノ粒子を合成した後は、詳細な構造解析を行なうとともに、それらの蛍光特性およびコロイド特性の評価を行う。

(3) (2)において良好な物性が確認された場合においては、実際に得られたナノ粒子を細胞に導入して、その蛍光イメージング能について評価を行う。

2. 研究の方法

本研究課題は以下の順序で遂行した。

(1) 以下に示すシード媒介成長法によって、物理吸着によって近赤外蛍光色素をシリカナノ粒子に固定した。粒径が約 40 nm のシリカナノ粒子をシード粒子として用意し、L-アルギニンに触媒としてシリカ源と蛍光色素を加え、粒子をさらに成長させた。この際、正に帯電する蛍光色素は負に帯電するシリカ表面に静電相互作用によって吸着し、この状態でシリカナノ粒子が成長することで、結果として近赤外蛍光色素が粒子内に固定された。さらに無毒化を行うために、ナノ粒子の最表面をタンニン酸 (TA) の膜で被覆した。

(2) 作製したナノ粒子の構造解析を行った。透過型および走査型電子顕微鏡により、粒子サイズや形状を観察した。続いて X 線光電子分光測定により、元素分析を行なった。また、合成時にシリカナノ粒子に取り込まれなかった蛍光色素を吸光分光法によって定量することで、ナノ粒子 1 個あたりに導入された蛍光色素の数を見積もった。

(3) 作製したナノ粒子の物性評価を行った。蛍光特性については、蛍光スペクトルおよび蛍光量子収率について調査した。光安定性については、励起光を照射し続けた際の蛍光強度に与える影響をナノ粒子内に固定化された蛍光色素と溶液中の蛍光色素で比較して検討した。コロイド特性については、動的光散乱測定により平均流体力学直径を求め、耐塩析性について調査した。

(4) ポリビニルピロリドン (PVP) を蛍光色素修飾シリカナノ粒子の表面に吸着させ、さらに PVP の上からシリカ被覆を行った。続いて、励起光の透過性を向上させるために塩基や加熱によってナノ粒子のシリカ部位を部分的にエッチングした。PVP と接触するシリカ層は、通常のシリカ層よりもエッチング耐性が高いため、この操作では内側のシリカ層でエッチングが先に進み、外側の粒子から分離してラトル型ナノ粒子が形成された。

(5) 作製したナノ粒子について、実際にアフリカミドリザル腎臓由来細胞に取り込ませて、in

in vitro で蛍光イメージング観察を行った。ナノ粒子の取り込み効率や経時安定性などから、蛍光イメージング能について検討した。

3. 研究成果

(1) について、図1に示されるスキームで近赤外蛍光色素の一種であるオキサジン725 (OXA) を物理的に固定化したシリカナノ粒子 (OXA@SiO₂ NP) を作製し、さらにタンニン酸で粒子表面を被覆した (OXA@SiO₂@TA NP)。まず、L-アルギニンを水に溶解させ、そこに粒径約40 nmのシリカのシード粒子水分散液と OXA のエタノール溶液を加え、70 °C まで昇温した。その後、テトラエトキシシラン (TEOS) を加え、70 °C で24時間攪拌した。反応終了後、遠心分離によって生じた沈降物を回収し、水を洗浄液として用いて精製した。得られたナノ粒子を水に分散させ、室温で、塩化鉄(III) (FeCl₃)、TA の順に添加することで、粒子表面を TA の膜で被覆した。

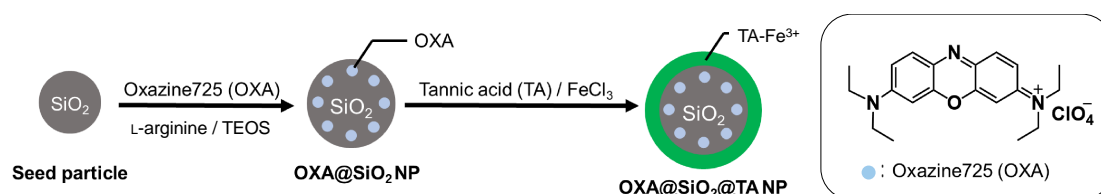


図1 OXA@SiO₂@TA NP の合成スキーム

(2) について、走査型電子顕微鏡により得られた粒子の平均粒径を求めたところ、OXA を固定化後に15 nm、タンニン酸被覆後にさらに15 nm程度粒径が大きくなっていることがわかった(図2)。X線光電子分光測定を行ったところ、TA被覆後に280 eV付近のC 1s由来のピークが増大し、710 eV付近にFe 2p由来のピークが新たに生じていた。これらの結果は、ポリフェノール類であるTAが三価の鉄イオンとの架橋を介して粒子を被覆したことを示している。また、合成時にシリカナノ粒子に取り込まれなかった蛍光色素を吸光分光法によって定量することで、ナノ粒子1個あたりに導入された蛍光色素は410分子と見積もられた。

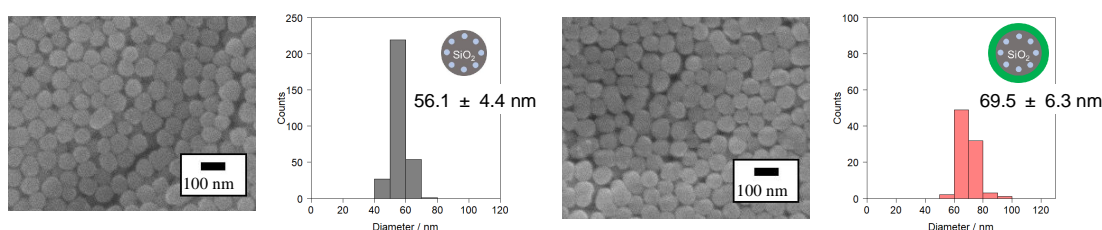


図2 OXA@SiO₂@TA NP (左) および OXA@SiO₂@TA NP (右) の走査型電子顕微鏡像

(3) について、OXA@SiO₂ NP の水分散液の蛍光スペクトルを蛍光色素単独 (free OXA) の結果と合わせて示す(図3)。OXA@SiO₂ NP では、680 nm 付近に OXA 由来の蛍光ピークを示した。固定化反応は溶液を70 °Cに加熱して行うが、free OXA の場合では加熱後に蛍光スペクトルが大きく変化したのに対し、シリカナノ粒子に固定した場合にはほとんど変化が見られなかった。つまり、ナノ粒子に固定されたことで蛍光色素の耐熱性が向上していることが示された。水溶液中における蛍光量子収率が求められたところ、free OXA で0.048、OXA@SiO₂ NP で0.198となった。OXA はシリカナノ粒子に固定されることで凝集に起因する消光が抑えられ、蛍光量子収率が改善することが示された。

光安定性については、free OXA、OXA@SiO₂ NP、OXA@SiO₂@TA NP のそれぞれの水分散液について、2.7 mW cm⁻² の強度で490 nm以上の励起光が連続的に照射され、その際の蛍光強度の変化を示す(図4)。free OXA では光照射によって大きく蛍光強度が減少したのに対し、蛍光色素をナノ粒子に固定した場合には、蛍光強度の減少が比較的抑えられた。特に、タンニン酸を被覆した場合には光照射によっても蛍光強度はほとんど変化しなかった。これは、ナノ粒子に固定されることで蛍光色素の光安定性が向上し、さらにTAが被覆することで溶媒中に含まれる光活性物質との接触が阻害されたためと考えられる。

コロイド安定性については、OXA@SiO₂ NP、OXA@SiO₂@TA NP のそれぞれの水分散液について、平均流体力学直径の経時変化を観察した。OXA@SiO₂ NP では、時間経過とともに平均流体力学直径の増加が見られたが、タンニン酸を被覆した場合には33日経過後においても平均流体力学直径はほとんど変化しなかった。これはナノ粒子の表面電荷の違いによるものと考えられる。それぞれのナノ粒子についてゼータ電位測定を行ったところ、OXA@SiO₂ NP では-37 mV、OXA@SiO₂@TA NP では-18 mVとなった。OXA は物理吸着で固定しているために、時間経過とともに少しずつナノ粒子から流出すると考えられるが、タンニン酸を被覆したナノ粒子では負に強く帯電していないためにOXAの表面吸着が抑えられ、長期間に渡って高い水分散性を

示したと考えられる。

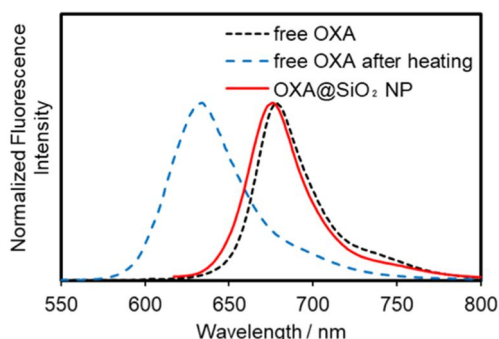


図3 free OXA および OXA@SiO₂ NP の水中における蛍光スペクトル

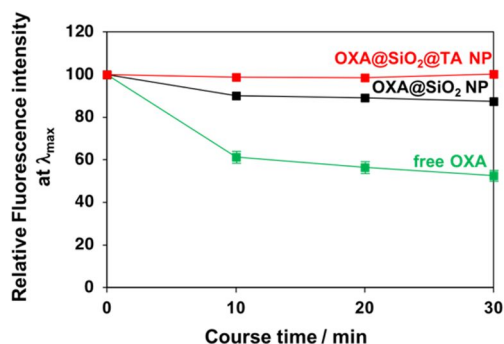


図4 free OXA、OXA@SiO₂ NP および OXA@SiO₂@TA NP の光安定性試験

(4) について、アニオン性もしくはカチオン性蛍光色素を修飾したシリカナノ粒子を合成し、ラトル型構造を形成させるためのシリカエッチング操作における蛍光色素の流出の有無について検討した。最初に、3-アミノプロピルトリエトキシシランと、アニオン性蛍光色素であるフルオレセインイソチオシアネート (F) またはカチオン性蛍光色素であるローダミン B イソチオシアネート (R) を反応させた。その後、これらの化合物と TEOS との共縮合によって蛍光色素修飾シリカナノ粒子 F(R)@SiO₂ NP を合成した。続いて、PVP による表面保護、シリカ被覆、さらに2回目の PVP 被覆を行い、F(R)@SiO₂@PVP@SiO₂@PVP NP を合成した。その後、アルカリ水溶液 (0.55 M 水酸化ナトリウム水溶液) もしくは熱水を用いてシリカ部分を部分的にエッチングした。このエッチング操作によって F(R)@SiO₂@PVP@SiO₂@PVP NP の蛍光強度が増加したが、これはエッチングによって励起光の光透過性が向上したためと考えられる。アルカリエッチングを行うと透過型電子顕微鏡よりラトル型構造の形成は確認されたが (図5)、上澄み液において粒子から流出したフルオレセインに由来する蛍光が検出された。一方、カチオン性蛍光色素の場合では、蛍光色素の流出は比較的抑えられていた。また熱水エッチングにおいてはアルカリエッチングよりも穏やかに反応が進行し、蛍光色素の流出はほとんど起こらず、エッチング後も高い水分散性を維持していることが示された。

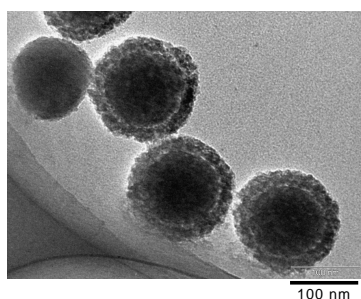


図5 アルカリエッチング後の F@SiO₂@PVP@SiO₂@PVP NP の透過型電子顕微鏡像

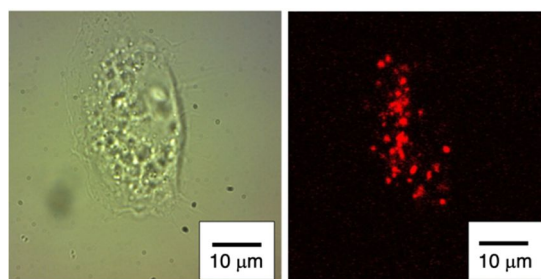


図6 OXA@SiO₂@TA NP を用いたアフリカミドリザル腎臓由来細胞の蛍光イメージング (左: 明視野像、右: 暗視野像)

(5) について、free OXA または OXA@SiO₂@TA NP をアフリカミドリザル腎臓由来細胞にリポフェクタミン 2000 を導入剤として用いて取り込ませ、24 時間培養後に蛍光顕微鏡によって観察した (図6)。結果として、OXA@SiO₂@TA NP を用いた場合では細胞から蛍光が観測され、一方で free OXA を用いた場合では、細胞から蛍光が観測されなかった。この結果は、free OXA では困難であったが、OXA@SiO₂@TA NP では細胞に取り込まれ、比較的長い時間細胞内に留まり、そして細胞中においても検知可能な強度で近赤外蛍光を発することができることを示している。

以上、本研究では、タンニン酸被覆オキサジン 725 内包シリカナノ粒子、フルオレセインまたはローダミン B 内包ラトル型シリカナノ粒子を合成し、得られたナノ粒子の形状、蛍光性、光安定性、色素担持性、水分散性などを明らかにした。いずれのナノ粒子も物理吸着を駆動力とするものの蛍光色素をナノ粒子内に安定に担持できることが特徴的であり、他の蛍光色素についても本研究で開発した手法によってシリカナノ粒子に効果的に導入されることが期待される。また、タンニン酸被覆オキサジン 725 内包シリカナノ粒子はアフリカミドリザル腎臓由来細胞に対して良好な蛍光イメージング能を示した。ナノ粒子の生体適合性 (ナノ粒子存在下における細胞生存率や細胞増殖性) については研究期間内に調査を実施できなかったが、今後の研究の進捗によって明らかとなっていくことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshio Nakahara, Yukiho Nakajima, Soichiro Okada, Jun Miyazaki, Setsuko Yajima	4. 巻 6
2. 論文標題 Synthesis of Silica Nanoparticles with Physical Encapsulation of Near-Infrared Fluorescent Dyes and Their Tannic Acid Coating	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 17651-17659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c02204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshio Nakahara, Yukiho Nakajima, Soichiro Okada, Jun Miyazaki, Setsuko Yajima
2. 発表標題 Synthesis of tannic-acid-coated silica nanoparticles encapsulating Oxazine 725 and their fluorescence properties in water
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋幸穂、中原佳夫、宮崎淳、矢嶋摂子
2. 発表標題 物理吸着による近赤外蛍光色素内包シリカナノ粒子の合成とタンニン酸被覆の検討
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中原佳夫、中嶋幸穂、宮崎淳、矢嶋摂子
2. 発表標題 シード媒介成長法による近赤外蛍光色素内包シリカナノ粒子の合成とタンニン酸による機能化
3. 学会等名 日本分析化学会第81回分析化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中原佳夫、四方祥瑚、矢嶋摂子
2. 発表標題 蛍光色素修飾シリカナノ粒子の化学エッチングと色素の流出挙動の検討
3. 学会等名 日本分析化学会第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲林春喜、中原佳夫、渡辺充、玉井聡行、矢嶋摂子
2. 発表標題 アニオン性の近赤外蛍光色素を内包するポリドーパミン被覆シリカナノ粒子の合成と色素の流出挙動の検討
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宮崎 淳 (Miyazaki Jun) (50467502)	和歌山大学・システム工学部・講師 (14701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------